

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Marburg
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. H. Kaffarnik

Erythrozytenlipide bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Zieve-Syndrom im Hämolyseschub und in der Remission

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Göldenstern
aus Herne

Marburg 1977

Angenommen vom Fachbereich der Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 19. 8. 1977
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. Fr. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik
Correferent: Prof. Dr. med. dent. K. Lehmann

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Marburg
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. H. Kaffarnik

"Erythrozytenlipide bei Stoffwechselgesunden und
Patienten mit Zieve-Syndrom im Hämolyseschub und
in der Remission"

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Güldenstern
aus Herne

Marburg 1977



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Themenstellung	1
2. Methodik	5
2.1. Patienten	5
2.2. Gewinnung von Erythrocyten	5
2.3. Isolierung von Erythrocytenmembranen	6
2.4. Isolierung der Lipidfraktion	7
2.5. Auftrennung der verschiedenen Lipidfraktionen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie	9
2.6. Bestimmung der Phosphatide	18
2.7. Lipidextraktion aus Erythrozytenmembranen zur Cholesterin- und Triglyceridbestimmung	22
2.8. Weitere Verarbeitung des Lipidextraktes	23
2.8.1. Cholesterinbestimmung	23
2.8.2. Bestimmung der Triglyceride	26
3. Statistik	32
4. Ergebnisse	34
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	40
7. Literaturverzeichnis	41



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung und Themenstellung

Durch die angesprochene Zunahme des Alkoholkonsums auch in Deutschland, auf die MARTINI (20) schon 1965 hingewiesen hat, sind die verschiedensten alkoholbedingten Stoffwechselstörungen immer häufiger zur Beobachtung gelangt.

Insbesondere der chronische Genuß von Alkohol führt direkt und indirekt zu Schädigungen des Organismus. Die Wirkung des Alkohols auf Gehirn, periphere Nerven, Lunge, Herz, Gastrointestinaltrakt, Haut- und Schleimhaut sowie auf das Endokrinum sei hier nur kurz erwähnt (20).

Schwerer Alkoholmißbrauch, vor allem die akute Alkoholintoxikation bei chronischen Alkoholikern, führt zu qualitativen und quantitativen Veränderungen aller drei hämopoietischen Systeme. Es wird auf einen über verschiedene Mechanismen möglichen hämolytischen Effekt auf die roten Zellen, auf funktionelle Störungen der Granulozyten und Immunozyten, auf qualitative Änderungen der Thrombozyten sowie auf einen für alle drei Zellreihen wahrscheinlich direkt toxischen Effekt auf die Zellproduktion hingewiesen (26).

Schon lange bekannt sind uns die vielfältigen Schäden der Leber, verursacht durch chronischen Genuß von Alkohol.

1958 beschrieb L. ZIEVE (27) eine Symptomentriade von Ikterus, Hyperlipoproteinämie und hämolytischer Anämie bei Alkoholikern mit bereits deutlich vorgeschädigter Leber, die uns heute unter dem Begriff Zieve-Syndrom ein Begriff ist. Diese Thematik hat seither das Interesse vieler Untersucher erregt.

Patienten mit Zieve-Syndrom suchen in der Regel wegen Oberbauchbeschwerden, Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe, ihren Arzt auf (18, 24). Bei der Anamnese wird jahrelanger Alkoholabusus offensichtlich. In den meisten Fällen besteht ein Ikterus. Die Diagnose wird durch die charakteristischen Labordaten einer Leberschädigung, Hyperlipoproteinämie Typ IV oder V, Hämolyse erhärtet (24).

Nach diesen Kriterien wurden 1970 von RÜDIGER (24) an der Medizinischen-Poliklinik Marburg, vier Patienten mit Zieve-Syndrom untersucht:

1. Leberschäden zeigten sich immer durch eine Erhöhung der Serumtransaminasen und histologisch durch eine stärkere Leberzellverfettung mit den Zeichen einer unspezifischen Entzündung sowie eine leichte Cholestase.
2. Hyperlipoproteinämie: Sie wird schon sichtbar durch das milchige Serum nach Blutentnahme bei nüchternen Patienten. Fast regelmäßig sind alle Lipidfraktionen im Serum erhöht. Bei fast allen Zuständen mit Lipoidvermehrung im Serum verhalten sich die Phosphatide und das Cholesterin annähernd parallel. Beim Zieve-Syndrom sind dagegen als Folge einer Cholestase die Phosphatide meist stärker erhöht. Bei stärkeren Leberschäden kann es aber auch zu einem Abfall der Serumphosphatide kommen.
3. Hämolyse: Im Vordergrund steht eine mäßige, normo- bis leicht hyperchrome Anämie mit Retikulozytose. Im Sternalmark ist die Erythropoese vermehrt. Über die osmotische Resistenz der Erythrozyten finden wir in der Literatur differente Aussagen (18, 24).

Mit der Aufklärung des Hämolysemechanismus beim Zieve-Syndrom haben sich schon sehr viele Autoren beschäftigt. Die Hämolyse wurde zeitweise in Zusammenhang gebracht mit erhöht gefundenem Lysolecithinspiegel im Serum als Folge einer Lipasewirkung auf zirkulierendes Lecithin (16). KATZ und Mitarbeiter (17) zeigten durch Kreuztransfusion, daß ein erworbener korpuskulärer Defekt der Erythrocyten vorliegen muß.

Andererseits ließen Kreuztransfusionsversuche von BALCERZAK et al (2) an einen extrazellulären Faktor, verantwortlich für die Hämolyse, denken.

MAXWELL et al (21), stellte einen synchronen Anstieg der Lipide roter Blutzellen mit den Serum-Lipiden bei Patienten mit Zieve-Syndrom im akuten Stadium fest, mit der gleichzeitig eine Abnahme der osmotischen Fragilität einherging.

Kürzlich wurde von GOEBEL et al (12) eine intrazelluläre Stoffwechselstörung in Wechselwirkung mit einer Enzyminstabilität der Erythrozyten mit Beteiligung einer vermehrten Destruktion der roten Zellen festgestellt.

GOEBEL et al (13) haben die mutmaßliche Rolle des Erythrozytenstoffwechsels im Zusammenhang mit membranverbundenen- oder äußeren Faktoren bei Patienten mit Zieve-Syndrom näher bestimmt.

Das gleichzeitige akute Auftreten einer Hyperlipoproteinämie und einer Hämolyse läßt an eine Veränderung der Erythrozytenmembranlipide denken, zumal Target-Zellformen nur im akuten Hämolyse Schub zu beobachten sind (15).

Da dieser Gesichtspunkt noch nicht geklärt ist, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, Erythrozytenlipide bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Zieve-Syndrom im

Hämolyseschub und in der Remission zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurden die Phosphatidfraktionen, Gesamtphosphatide, Cholesterin- und Triglyceridgehalt der Erythrozytenmembran bestimmt. Diese Untersuchung konnte bei 8 Zieve-Syndrom-Patienten im Hämolyseschub und in der Remission durchgeführt werden. Als Kontrolle dienten 6 Stoffwechselgesunde.

2. Methodik

2.1. Patienten

Die Patienten unserer Untersuchung sind 8 chronische Alkoholiker im Alter von 24 bis 74 Jahren mit Zieve-Syndrom. Sie bilden in unserer Untersuchung im Hämo-lyseschub die Gruppe A.

In der Remissionsphase wurde bei den gleichen Patienten eine Kontrolluntersuchung durchgeführt. Sie bilden hier die Gruppe B.

Aus 6 gesunden Probanden bestand eine Vergleichsgruppe C.

Bei allen Mitgliedern der entsprechenden Gruppen erfolgte eine Blutentnahme von 20 ml, das mit ACD stabilisiert wurde.

2.2. Gewinnung von Erythrocyten

Da Stoffwechseluntersuchungen an Erythrocyten eine optimale Elimination der Leuko- und Thombocyten voraussetzt, bietet sich die Erythrocytenisolierung aus Blut mit Baumwolle nach D. BUSCH und U. PELZ (5) als bestmögliche Methode an, da mit keinem anderen bisher bekannten Verfahren eine reinere Erythrocytenfraktionierung erreicht werden konnte. Auf 10^4 Erythrocyten kommen nur 1-0,1 Leukocyten und 50 Thrombocyten.

Durchführung

Mit sterilisierten Baumwollfäden, geknotet und in Aqua bidest. aufbewahrt, wird eine Glassäule in Höhe 1/3 bis 1/2 nicht zu fest gefüllt. Diese Baumwolle wird 5mal mit

0,9 %er NaCl-Lösung gewaschen. Das ACD-stabilisierte Vollblut wird gut gemischt langsam über die Säule gegeben und in Zentrifugierröhrchen aufgefangen. Es wird solange mit NaCl nachgespült, bis die Baumwolle fast klar wird. 15 Minuten wird das aufgefangene Blut sodann bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Zentrifugenröhrchen werden wiederum mit 0,9 %er NaCl-Lösung aufgefüllt, vorsichtig mit dem Zentrifugat gemischt und wieder wie zuvor zentrifugiert. Auf diese Art und Weise werden die Erythrocyten mindestens 3mal gewaschen, bis der abzusaugende Überstand ganz klar ist.

2.3. Isolierung von Erythrocytenmembranen

Reagentien

Lösung I: Digitonin (gesättigte Lösung)

1g ad 100,0 ml Aqua bidest

(Firma Merck/Digitonin, M.G. 1229, 34,
C 56, H 92, O29).

Lösung II: TRA-Puffer ph 7,5 0,1 M

18.57 g TRAP (Triäthanolamin-Hydrchlorid Uris.
MG. 185, 7, 15325; Boehringer) einwiegen, in
900,0 ml Aqua bidest lösen. 2,00 g EDTA
(Idranal III - Dinatriumsalz; Fa. Riedel)
in die Lösung geben.

Mit NaOH auf ph 7,5 einstellen, auffüllen
auf 1000 ml Aqua bidest.

Durchführung

Die Präparation der Erythrocytenmembran erfolgte nach DOTGE, MITCHEL und HANAHN (8). Die Erythrocytensuspensionen aller Röhrchen werden zusammengegossen, 1:3 mit 0,9 %igem

NaCl verdünnt, gut gemischt und in folgende Lösung eingesetzt:

- 1,0 ml Ery-Suspension
- + 0,20 ml Digitonin, Lösung I
- + 0,80 ml Aqua bidest
- + 1,00 ml TRA-Puffer, Lösung II

Es wird vorsichtig gemischt, und die Lösung wird anschließend für 30 min. in den Kühlschrank gestellt; danach bei 3000 U/min 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig verworfen, den Bodensatz bilden die Erythrocytenmembranen. Sie werden tiefgefroren und so zur Bestimmung der Lipidfraktionen, Cholesterin- und Triglyceridbestimmung aufbewahrt.

2.4. Isolierung der Lipidfraktion

Chemikalien:

a) Chloroform - Methanol im Verhältnis 2:1
 CHCl_3 - CH_3OH

b) NaCl 0,1 n

c) N_2

Die Isolierung der Lipide aus den Erythrocytenmembranen erfolgte nach der Methode von FOLCH (11).

Durchführung

Im Verhältnis 1:19 werden Erythrocytenmembranen in Lösungsmittel a) gegeben. Dabei werden zunächst 57 ml a) in ein 100ml Standkölbchen geschüttet, in einem Heißwasserbad auf 50°C erhitzt und danach tropfenweise 3ml Membranen hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln wird

das Kölbchen in ein Heißwasserbad von 70°C gestellt und unter ständigem Schütteln 1 Minute belassen. Durch einen Filter wird die Flüssigkeit zur Volumenbestimmung in einen Standzylinder überführt. Anschließend wird das Lösungsmittelgemisch in einen Schütteltrichter gegossen und 1/5 des im Standzylinder gemessenen Volumens an b) hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln über 10 Minuten wird der Schütteltrichter rund 16 Stunden in den Kühlschrank gestellt.

Die in Chloroform enthaltenen Lipide (untere Phase) werden in einen Rundkolben abgelassen und in einem Rotationsverdampfer bei 36°C eingeengt. Die zurückbleibenden Gesamtlipide werden nochmals in 1-2 ml der Lösung a) gelöst und in einen kleinen, vorher mit Stopfen gewogenen Spitzkolben, pipettiert. Ferner wird dreimal mit 1ml des Lösungsmittels a) der Rundkolben ausgespült, abpipettiert und ebenfalls in den Spitzkolben gegeben.

Die Lipide werden wiederum am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wird das Kölbchen mit Stickstoff c) belüftet.

Danach wird das Kölbchen im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Auch der Vakuumexsikkator wird mit Stickstoff belüftet.

8 - 10 mg der Gesamtlipide werden herausgekratzt und auf einer vorher gewogenen Glasscherbe mit Hilfe einer Mikrowaage gewogen. Die Lipide werden mit der Scherbe in ein Kölbchen eingeführt und von dieser mit 1 ml Lösungsmittel a) gelöst.

2.5. Auftrennung der verschiedenen Lipidfraktionen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie

Methode:

Die Methode wurde von DEBUCH et al (6) beschrieben.

Prinzip:

Das Prinzip der Methode beruht auf der Phosphorbestimmung der von der Chromatographieplatte entnommenen Phospholipidfraktionen.

Chemikalien:

- a) N_2
- b) Na_2CO_3 - Lösung (gesättigt)
- c) J_2
- d) $HClO_4$ 70%ig
- e) Ammoniummolybdatlösung 0,22%ig
- f) Lösung, Chloroform - Methanol, 2:1

Reagentien:

- a) Fiske - Subarow - Reagenz:

6,85	g	$Na_2S_2O_5$	Natriumdisulfit
+	1	g	Na_2SO_3 Natriumsulfit
+	0,125	g	$C_{10}HgNO_4S$ 1-Amino-2-hydroxy-
+			naphtalinsulfonsäure- (4)
			Aquabidestillat ad 50ml

- b) Laufmittel I

130 ml $CHCl_3$

50 ml CH_3OH

8 ml H_2O (bidest)

c) Laufmittel II

130 ml CHCl_3

50 ml CH_3OH

16 ml CH_3COOH

d) Adsorbens

MN-Kieselgel N-HR/DC,

mittlere Korngröße 20 - 40 μm

(Firma Mackerey, Nagel & Co., Düren)

Durchführung

Prinzipiell werden Lösungen mit bidestilliertem Wasser angesetzt und alle Glasgeräte in bidestilliertem Wasser nachgewaschen. Die Platten sollten so wenig wie möglich an der Luft liegen, wenngleich auch unter den hier beschriebenen Bedingungen der Feuchtigkeitsgehalt der Platten nicht standardisiert ist. So findet man auch stets Unterschiede in den R_f -Werten, selbst bei Bearbeitung eines und desselben Phosphatides. Da sich der Feuchtigkeitsgehalt der Kieselgelschicht jedoch durch den verschiedenen Feuchtigkeitsgehalt der Luft beim Auftragen der Proben ändert, verzichteten wir darauf, eine Standardisierung der Feuchtigkeit vorzunehmen.

Herstellung der Platten

Glasplatten (20 x 20 cm) werden einige Stunden in konzentrierte Na_2CO_3 -Lösung gestellt, um sie zu entfetten, mit Wasser und bidestilliertem Wasser gespült und im Trockenschrank kurz getrocknet.

5 Platten beschichtet man mit Adsorbens d), indem man 60 g Kieselgel mit 110 ml Wasser gut geschüttelt (7-10 Min.) und mit dem Streichgerät (C.Desaga, Heidelberg)

in einer Dicke von 300 - 375 μ m nach 20 Sekunden Stehenlassen innerhalb von 12 - 15 Sekunden aufträgt.

Nachdem die Platten etwa eine Stunde an der Luft trocknen, werden sie 30 Minuten bei 110°C aktiviert (Trockenschrank nur langsam anheizen, da sonst die Kieselgelschicht leicht rissig wird.

Die Platten werden über Blaugel im Exsikkator aufbewahrt. Auf 3 Platten werden, 2 cm vom linken und unteren Rand entfernt, 300 - 400 μ g Lipoidgemisch (etwa 15 μ g Phosphor) mit einer Mikrometerpipette (Agla, Brand Micrometer Syringe, Burroughs Willcome & Co., London), in etwa 150 μ l Chloroform-Methanol gelöst, aufgetragen. Zur kontrollierten Einengung der Lösungsmittel wird ein kalter Föhn auf die Auftragsstelle gerichtet. Der Durchmesser des aufzutragenden Fleckes darf nicht größer als 10 mm sein. Mit der gleichen Pipette werden 3 Proben von 50 μ l in spitz ausgezogene Schliffzentrifugengläser pipettiert und am Rotationsverdampfer eingeengt, um den Phosphorlipidgehalt der aufgetragenen Lipidlösung zu ermitteln.

Entwicklung des Chromatogramms

Jede Chromatographieplatte wird 1 1/4 Std. senkrecht in eine Laufkammer I mit Laufmittel I gestellt (Laufstrecke 16 cm). Die in der 1. Richtung entwickelten Platten werden in einem leeren Exsikkator (Nr. 1) 30 Min. evakuiert (Ölpumpe). Die Trocknungszeit sollte nicht mehr als 30 Min. betragen, da sonst die Gefahr einer Veränderung der Lipide auf der Kieselgelschicht zu groß wird. Dann wird langsam mit N₂ belüftet.

Die Chromatographieplatten werden in den Laufkammern II mit Laufmittel II nun in der zweiten Richtung 1 1/4 Std. entwickelt (Laufstrecke 16 cm).

Falls die Platten nicht sofort weiterverarbeitet werden können, sollten sie in einem leeren Exsikkator (Nr. 2) aufbewahrt werden. Allerdings ist es nicht ratsam, die Platten nach dem Entwickeln in Laufmittel I in den Exsikkator Nr. 2 zu stellen, da sich in diesem Spuren von Essigsäure an der Wand befinden können, die bereits eine Hydrolyse der Enolätherbindung von Plasmalogen bewirken, so daß sich dann bei der Entwicklung in der 2. Richtung Lysophosphatide zeigen (siehe Abb. 1, 2 und 3).

Abnahme der einzelnen Phosphatidkomponenten von der Platte

Um die Flecken sichtbar zu machen, wird die entwickelte Platte in eine Kammer mit J_2 -Dämpfen gestellt, die Flecken in möglichst großer Abstand mit einer spitzen Sonde zur Markierung umstichelt und wieder (Exsikkator Nr. 2) solange im Vakuum gehalten, bis die Jodfärbung nur noch schwach zu sehen ist. Nach der Entnahme wird die Platte mit ca. 20 ml bidest. Wasser besprüht, und die einzelnen Phosphatidkomponenten werden mit dem Kieselgel an der Wasserstrahlpumpe bei sehr schwachem Vakuum durch eine Absaugvorrichtung in Schliffzentrifugengläser gesaugt (wenn die Kieselgelschicht ganz trocken ist, tritt ein Absaugverlust ein). Im Zentrifugenglas sollen sich jeweils 0,4 ml 70%iges $HClO_4$ befinden, bevor mit dem Absaugen des Kieselgel begonnen wird, um ebenfalls einen Absaugverlust zu verhindern. Mit 0,3 ml 70%igem $HClO_4$ werden die Wände des Zentrifugenglases nach dem Absaugen gewaschen.

Bestimmung des Phosphorschalters der einzelnen Komponenten

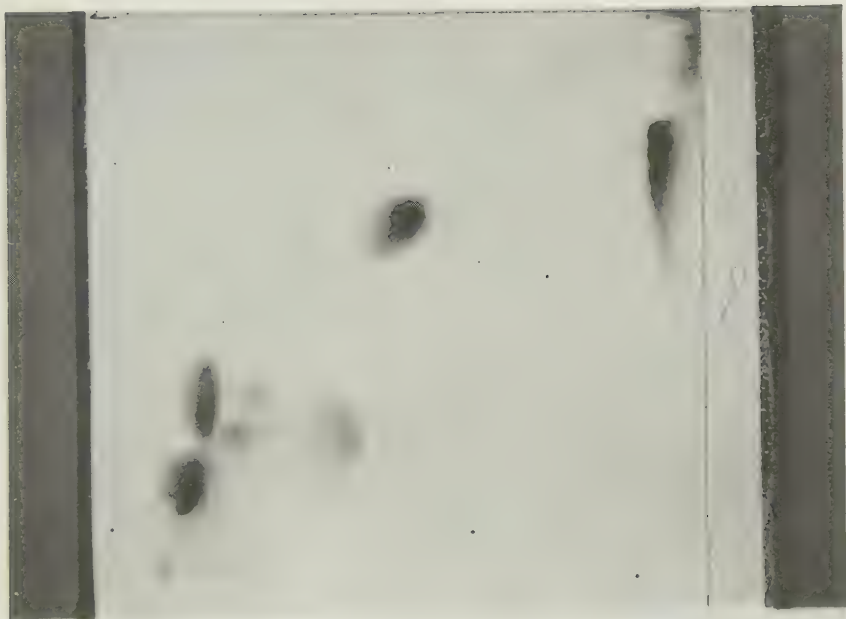
Die Proben werden in einem Aluminiumblock 30 Minuten bei $180^\circ C$ verascht. Der Block wird jedoch langsam angeheizt und 30 Min. bei $180^\circ C$ belassen, um einen Siedeverzug zu vermeiden; die offenen Zentrifugengläser anschließend

herausgenommen und auf Zimmertemperatur gekühlt. Dann gibt man 4,6 ml 0,22%ige Ammoniummolybdatlösung, 0,2 ml Fiske - Subbarow - Reagenz (10) dazu, schüttelt die mit Schliffstopfen verschlossenen Gläser 20 Sekunden mit dem Vortex-Mixer gut um und hält sie für 10 Minuten bei etwa 90° C im Wasserbad (unter mehrmaligem Schütteln). Anschließend werden die Gläser nach erneutem Schütteln (etwa 10 Sek.) sofort 5 Min. bei 3600 U/min. zentrifugiert und die Lösung vom Kieselgeldekandiert. Es wird die Extinktion bei 815 nm gegen den Blindwert mit einem Zeiss-Spektralphotometer gemessen.

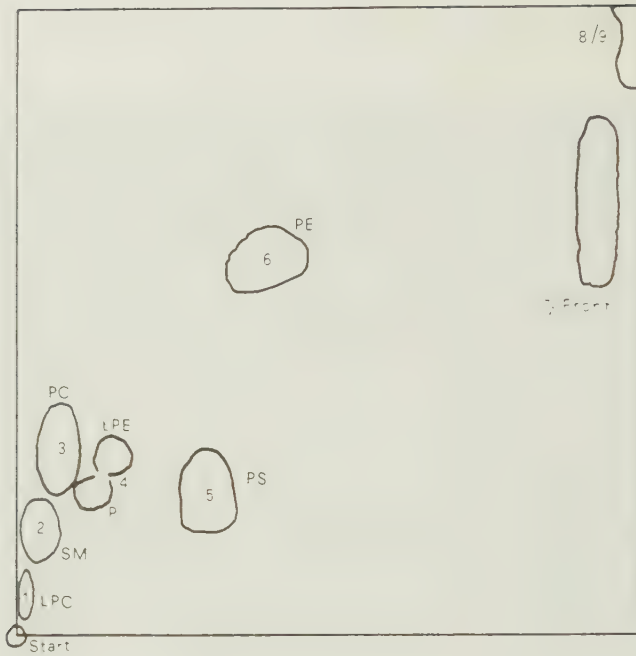
Blindwert: 0,7 ml HClO_4 + Reagenzlösungen verascht usw. s.o.

Leerwert: Eine etwa der Größe der Flecken entsprechende Menge Kieselgel (z.B. etwa 2,5 cm²) wird von der Platte am Rande dort entnommen, wo sich sicher keine Substanz befindet und wie die Probe behandelt.

Test: Etwa 12 mg Dinatriumphenylphosphat p.A. werden in 200 ml Wasser gelöst, davon 0,5 ml (etwa 30 µg Dinatriumphenylphosphat, d.h. etwa 3,65 g P enthaltend) werden in Zentrifugengläser pipettiert, das Wasser am Rotationsverdampfer abdestilliert, die Proben verascht, und der P-Gehalt wird wie oben bestimmt. Die Extinktionswerte liegen um 0,600. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde, um sich eine Orientierung über die einzelnen Komponenten zu verschaffen, mit einer der drei chromatographierten Platten eine differenzierte Färbung in der Reihenfolge: Anfärbung mit Ninhydrin (19), anschließend Färbung auf Phosphatide (7) und schließlich Veraschung (28), durchgeführt.



Entwickeltes Chromatogramm
angefärbt in Joddämpfen



Phospholipid-Fraktionen

1. (LPC) Lysophosphatidyl choline
2. (SM) Syphingomyelin
3. (PC) Phosphatidyl choline
4. (LPE/PI) Lysophosphatidyl ethanolamine u.
phosphatidyl insosit
5. (PS) Phosphatidyl serine
6. (PE) Phosphatidyl ethanolamine

Abb.: 3

Photometrische Bestimmung der Phospholipide

Die Photometrische Bestimmung wurde an einem Spektralphotometer PMQ 2 der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in 10 mm Quarzküvetten bei einer Meßwellenlänge von 815 nm durchgeführt. In jeder Meßreihe wurden jeweils zwei Blindwerte mituntersucht und deren Extinktion gegen H_2O gemessen. Die Extinktionen der Proben wurden jeweils gegen den höheren Blindwert bestimmt. Aus den Extinktionen der Proben wurde anschließend die prozentuale Zusammensetzung des Gemisches errechnet.

Wiederfindungsrate

Während des ganzen Versuchsherganges wurden die drei Schliffreagenzgläser mit jeweils 50 μ l eingeengter Gesamtlipide - bis auf zentrifugieren und dekantieren - genauso behandelt wie jede einzelne Phosphatidfraktion.

Aus dem Vergleich der Summe der Extinktionen der Gesamtlipide und der Summe der Extinktionen der Einzelfraktionen ergibt sich die Wiederfindungsrate in %, wenn die Summe der Extinktionen der Gesamtlipide gleich 100 % gesetzt wird.

Identifizierung der Einzelfraktionen

Die Identifizierung der Einzelfraktionen wurde nach DEBUCH, MERTENS und WINTERFELD (6) ferner nach LEA (19), DITTMER (7) und ZÖLLNER (28) vorgenommen.

Auswertung

Ausgewertet wurden jeweils nur die identifizierten Fraktionen 1 - 6; Startfleck, Frontlinie und die nicht identifizierten Fraktionen 7/8 in der Front wurden nur bei der Berechnung der Wiederfindungsrate mitberücksichtigt.

Die Summe der Extinktionen (E) der Phosphatidfraktionen (PF) 1 bis 6 wurde gleich 100 % gesetzt.

$$E_i = E (PF_i)$$

$$E = \sum_{i=1}^6 E_i = 100 \%$$

Der prozentuale Anteil der Einzelfraktionen wird dann wie folgt berechnet:

$$E (PF_i) = \frac{100 \% \cdot E_i}{E}$$

2.6. Bestimmung der Phosphatide

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte nach der Methode von BARTLETT (3) mit der Veraschung nach ALLEN (1) nach Extraktion der Lipide in der Arbeitsweise von FOLCH et al (11), beschrieben von BEHRENS (4).

Prinzip:

Nach Extraktion der Lipide wurde Lipidphosphor im FOLCH-Extrakt durch Veraschung und anschließende Entwicklung von Phosphormolybdänblau bestimmt und über die Extinktion im ZEISS-Spektralphotometer der Phosphatidgehalt berechnet.

Chemikalien:

- a) Chloroform DAB 6
- b) Methanol p. a.
- c) NaCl p. a.

- d) Perchlorsäure 70%ig p. a.
- e) Ammoniummolybdat p. a.
- f) Natriumsulfit p. a.
- g) 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure p. a.
- h) Natriumpyrosulfit p. a.
- i) Kaliumdihydrogenphosphat p. a.
- j) konz. Schwefelsäure p. a.

Reagentien:

Reduktionsreagenz nach FISKE und SUBBARROW (10):

Zu 200 ml frisch hergestellter 13,7%iger Natriumpyrosulfitlösung werden unter Umrühren 0,5 g 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure und 2,0 g wasserfreies Natriumsulfit gegeben. Die Lösung wird filtriert und in dunkler Flasche aufbewahrt. Sie muß alle 2 - 3 Wochen frisch angesetzt werden.

Ammoniummolybdat: 0,22 %ig

(1,1 g ad 500 ml aqua bidest.)

Anorganischer Phosphorstandard:

0,3509 g des Kaliumdihydrogenphosphats werden nach Trocknung während einer Nacht in einer Trockenpistole mit Phosphorpentoxyd bei + 60°C in einem 1000 ml-Meßkolben in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach Zusatz von 10 ml 10 n Schwefelsäure wird mit aqua bidest. bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Die so hergestellte Stammlösung enthält in 50 ml 0,4 g Phosphor. Sie ist unbegrenzt haltbar und muß wegen Verdunstungsgefahr gut verschlossen aufbewahrt werden.

Durchführung der Extraktion der Lipide:

In einem Meßkölbchen wurden 0,5 ml Erythrozytenmembranen und 16 ml Chloroform mit Methanol auf 25 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit wurden 20 ml des Filtrats in einen Schütteltrichter überführt und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach mehrmaligem kräftigen Schütteln wurde die Lösung zur Absetzung der Chloroformphase für 30 Minuten stehengelassen, daraufhin konnte die Chloroformphase durch einen Papierfilter in ein Schliffgläschen abgelaassen werden und in die Phosphatidbestimmung eingehen.

Durchführung der Phosphatidbestimmung:

Die Analyse wurde wiederum als Doppelbestimmung durchgeführt.

0,5 ml der bei der Extraktion der Lipide gewonnenen Chloroformphase wurden eingedampft, mit 0,4 ml 70%iger Perchlorsäure versetzt und anschließend über 60 Minuten verascht in einem Sandbad bei + 180 °C. Nach Erkalten erfolgte die Zugabe von 4,6 ml einer 0,22%igen Ammoniummolybdatlösung und 0,4 ml Reduktionsreagenz.

Nach gutem Schütteln wurden die verschlossenen Reaktionsgefäße in ein leicht siedendes Wasserbad gestellt und nach 7 Minuten abgekühlt.

Es wurden Leerwerte mitgeführt, indem in leere Reagenzgläser 0,4 ml 70%ige Perchlorsäure gegeben und mit den Röhrchen in analoger Weise wie mit den Analysenproben weiterverfahren wurde.

Gesondert wurden Standardproben mitgeführt.

Hierzu wurden am Tag der Bestimmung 2,5 ml der Standardlösung mit Aqua bidest. auf 50 ml verdünnt. In zwei Reagenzgläser wurden je 0,5 ml dieser Tagesphosphorlösung pipettiert, eingedampft und mit den übrigen Proben weiterverarbeitet.

Das Ablesen der Extinktionen erfolgte gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge von 830 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm im Spektralphotometer nach ZEISS.

Berechnung:

Wegen der Verdünnung der Plasmaproben bei der Extraktion gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt:

$$\text{Phosphor/ml Plasma} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32$$

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt, multipliziert mit dem Faktor 25:

$$\frac{\text{mg Phosphatide (als Lecithin)}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1 \cdot 25$$

So ergibt sich für die Konzentration c_{Ph} der Phosphatide in den Plasmaproben:

$$c_{Ph} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 320 \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$$

Kritik:

Durch das abschließende siebenminütige Erhitzen wird die Farbbildung intensiviert, und es entsteht ein steiles Maximum im Absorptionsspektrum bei 830 nm. Durch die hohe Empfindlichkeit der Reaktion ist diese anfällig gegen Verunreinigungen, insbesondere gegen Reste von Spülmitteln oder gegen schlecht destilliertes Wasser.

2.7. Lipidextraktion aus Erythrozytenmembranen zur Cholesterin- und Triglyceridbestimmung

Die Extraktion der Lipide erfolgte nach der Methode von FOLCH (11) modifiziert nach ROSE u. OKLANDER (23).

Durchführung:

Mit einer silikonsierten serologischen Pipette werden 1 ml Erythrozytenmembranen in ein 20 ml Reagenzröhrchen mit Stopfen pipettiert. 1 ml bidest. Wasser wird hinzugeführt und der Inhalt des Röhrchens mit einem Vortex Junior Mixer 15 Min. gemischt.

Unter langsamen Mischen werden 11 ml Isopropanol langsam hinzugegeben. Nach einer Stunde und gelegentlichem Mischen wird 7 ml Chloroform (chem. rein) dazugegeben und nach wiederum einer weiteren Stunde mit 3000 U/min. 10 Min. zentrifugiert.

Die Flüssigkeit wird in ein anderes Reagenzglas abgesaugt und mit 2 ml 0,05 n KCl versehen.

10 Minuten wird dies miteinander gemischt und anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf ca. 2 ml eingengt. Danach wird genau gewogen.

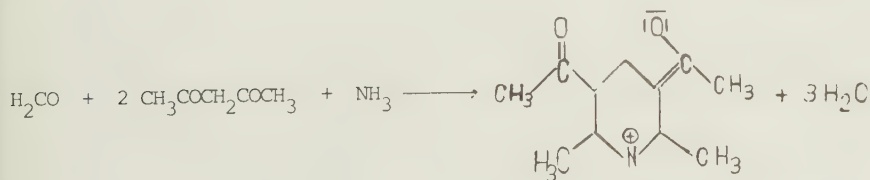
2.8. Weitere Verarbeitung des Lipidextraktes

2.8.1. Cholesterinbestimmung

Das Cholesterin wurde enzymatisch nach ROESCHLAU et. al. bestimmt (22) beschrieben von JABIR (14). Testprinzip: Cholesterinoxidase oxidiert Cholesterin unter Sauerstoffverbrauch zu 4 - Cholestenon und Wasserstoffperoxid:

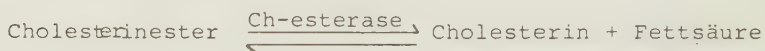


Zur Ermittlung des freien Cholesterins wird das gebildete Wasserstoffperoxid mittels Katalase nach folgendem Schema bestimmt:



Die Farbtintensität des gebildeten 3,5 - Diacetyl - 1,4 - dihydrolutidins kann bei 400 - 415 nm gemessen werden.

Da Cholesterin im Serum normalerweise zu 60 - 75 % in veresterter Form vorliegt, wurde der Cholesterinbestimmung eine enzymatische Esterspaltung vorgeschaltet:



Konzentration der benutzten Lösungen (Testkombination BOEHRINGER):

1. 0,6 M Ammoniumphosphat-Puffer, pH 7;
1,7 M Methanol; Katalase $\geq$ 700 U/Ml
2. 0,42 M Acetylaceton; 2,5 M Methanol;
2,1 % Hydroxypolyäthoxydodecan;
3. Cholesterinesterase $\geq$ 7 U/ml
4. 0,57 M Ammoniumphosphat-Puffer, pH 7;
1,7 M Mathanol;
0,02 M Acetylaceton;
0,1 % Hydroxypolyäthoxdodecan;
Katalase $\geq$ 670 U/ml;
Cholestrinesterase $\geq$ 25 mU/ml

Herstellung der Lösungen:

Lösung 1: Das Konzentrat wurde in 50 ml bidest. Wasser verdünnt.

Lösungen 2, 3, 4 verwendeten wir unverdünnt.

Lösung 5 (Cholesterin-Reagenz) wurde nach folgender Tabelle gemischt:

Mischungstabelle für Cholesterin-Reagenz:

Anzahl der Proben		ml Lösung 1	ml Lösung 2	ml Lösung 3
ca.	5	25	1,25	0,1
	10	50	2,5	0,2
	20	100	5,0	0,4
	30	150	7,5	0,6
	40	200	10,0	0,8
	50	250	12,5	1,0
	60	300	15,0	1,2
	70	350	17,5	1,4
	80	400	20,0	1,6
	100	500	25,0	2,0
	120	600	30,0	2,4
	140	700	35,0	2,8
	160	800	40,0	3,2
	180	900	45,0	3,6

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Hg 405 nm

Spektralphotometer: 410 nm

Glasküvette: 1 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 37 °C

0,1 ml Serum wurde mit 1,0 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9%ig gemischt und 0,2 ml dieser Verdünnung eingesetzt.

Auf den Boden der Reagenzgläser wurde pipettiert:

	<u>Probenleerwert</u>	<u>Probe</u>
verdünnte Probe	0,20 ml	-
Lösung	5,00 ml	-

nach guter Mischung erfolgten folgende Schritte:

Lösung 4	-	0,02 ml
aus dem Reagenzglas		
des Probenleerwertes		
abpipettieren	-	2,50 ml

gut mischen. Probenleerwert und Probe wurden 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Extinktion gegen den Leerwert.

$$c = 1494 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ (mg/100 ml) bzw.}$$

$$c = 38,6 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ (mMol/l)}$$

bei 410 nm

$$c = 1471 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ (mg/100 ml) bzw.}$$

$$c = 38,0 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ (mMol/l)}$$

2.8.2. Bestimmung der Triglyceride

Die Analyse der Triglyceride erfolgte nach der Methode von EGGSTEIN und KREUTZ (9) sowie SCHMIDT et al. (25).

Prinzip:

Bei dieser enzymatischen Bestimmung wird im Prinzip nach vollständiger Hydrolyse Glycerin mit Adenosintriphosphat (ATP) und Glycerokinase umgesetzt und mit den Hilfsenzymen Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase im optischen Test der NADH-Verbrauch gemessen.

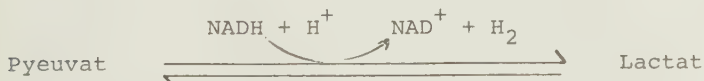
Dabei wird nach der Verseifung der Fette das entstandene Glycerin in der durch das Enzym Glycerokinase (GK) katalysierten Reaktion mit Hilfe von ATP zu Glycerin-1-Phosphat phosphoryliert:



Durch das Enzym Pyruvatkinase (PK) wird das entstandene ADP durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt:



Pyruvat wird nun durch NADH mittels Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD^+ oxydiert wird:



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist äquivalent der vorhandenen Glycerinmenge, d.h. die Abnahme der Lichtabsorption durch Oxydation von NADH zu NAD^+ ist der Glycerinmenge im Reaktionsansatz direkt proportional und kann bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen werden.

Gesamtes Glycerin weniger freies Glycerin entspricht dem veresterten Glycerin in den Neutralfetten.

Chemikalien:

Triäthanolaminpuffer

MgSO₄ reinst

NADH

Phosphoenolpyruvat

ATP

Lactatdehydrogenase

Pyruvatkinase

Glycerokinase

MgSO₄-Lösung (etwa 0,15 M)

äthanolisches KOH (etwa 0,5 M)

Reagentien:

Lösung I : Puffer : 4 mM Triäthanolaminpuffer und 0,16 mM MgSO₄ werden in 40 ml aqua bidest. gelöst, es resultiert ein pH von 7,6.

Die Lösung ist bei Zimmertemperatur etwa ein Jahr haltbar.

Lösung II : 3,6 M NADH, 19,8 M ATP und 6,6 M PEP werden in 0,6 ml aqua bidest. gelöst.

Die Lösung ist bei + 4°C über zwei Wochen haltbar.

Lösung III: 2 mg LDH und 1 mg PK sind in einem Milliliter der Suspension enthalten.

Die Suspension ist bei + 4°C etwa über ein Jahr haltbar.

Lösung IV : 2 mg GK sind in einem Milliliter der Suspension enthalten.

Die Haltbarkeit beträgt bei + 4°C ebenfalls etwa ein Jahr.

Durchführung der Triglyceridbestimmung:

Zur Bestimmung der Triglyceride wurde ebenfalls eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Von jedem Extrakt wurden 0,2 ml in ein Zentrifugenglas pipettiert, 0,5 ml der äthanolischen Kalilauge dazugeben und die Lösung kräftig durchmischt. Die mit PARAFIN-Film verschlossenen Röhrchen wurden darauf für 30 Minuten in ein Wasserbad von $+ 70^{\circ}\text{C}$ gestellt, danach ließen wir sie wieder auf Raumtemperatur abkühlen. Im folgenden wurde in jeden Ansatz 1,0 mg MgSO_4 -Lösung pipettiert, gut gemischt, die Lösung wurde 8 Minuten bei 5.000 U/min zentrifugiert und 0,2 ml des klaren Überstandes zur Glycerinbestimmung abgenommen.

Für diese Analyse wurden von Lösung I 1,0 ml, von Lösung II 0,05 ml, nun die nach der Verseifungsreaktion entnommenen 0,2 ml des klaren Überstandes sowie von Lösung III 0,01 ml in eine Küvette der Schichtdicke 1 cm pipettiert. Das Gemisch wurde mit einem Plastikspatel durchgerührt und bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen.

Hierauf wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm die Extinktion E_1 im Photometer EPPENDORF gegen Luft gemessen.

Anschließend wurde von Lösung IV 0,01 ml zugegeben, abermals durchgemischt und nach weiteren 10 Minuten wieder die Extinktion als E_2 gegen den Leerwert Luft bestimmt.

Berechnung:

Für die Berechnung von Substratkonzentration gilt allgemein die Gleichung:

$$c = \frac{\text{MG}}{\xi \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot \Delta E \cdot \frac{\text{mg}}{100 \text{ mg}}$$

Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei 366 nm $3,3 \text{ cm}^2 / \text{Mol}$.

Der Gehalt an Neutralfett wird über seinen Glycerinanteil berechnet. Das mittlere Molekulargewicht der Plasmaliglyceride beträgt 885, das des Glycerins 92. Außerdem muß die durch die Verseifung eingetretene Verdünnung berücksichtigt werden, was mit Hilfe des Faktors F geschieht:

$$F = \frac{885 \cdot 1,70}{92,1 \cdot 0,2} = 81,68$$

V ist das Volumen der insgesamt in die Küvette einpipetierten Lösungsmengen (1,27 ml), v das Volumen des eingesetzten Überstandes der Verseifungsreaktion (0,2 ml).

Für ΔE gilt: $\Delta E = E_1 - E_2$

Zu berücksichtigen ist noch der Durchschnittsgehalt des Extraktes an freiem Glycerin mit 1,0 mg/100 ml, was nach den oben angeführten Molekulargewichten etwa 10 mg/100 ml Neutralfett entspricht.

So ergibt sich für die Konzentration c der Triglyceride im Plasma folgende Bestimmungsgleichung:

$$c = (1432 \cdot \Delta E - 10) \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$$

3. Statistik

Die Membranproben sämtlicher Patienten wurden jeweils in einer Doppelbestimmung analysiert.

Die für die Proben der 8 Probanden der Gruppe A bzw. B und 6 Probanden der Gruppe C gemessenen Werte bei der Gesamtcholesterin-, Triglycerid- bzw. Phosphatidbestimmung wurden arithmetisch gemittelt ($\bar{x}$) über:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad , \quad \begin{matrix} A & B & C \\ (n = 8) & (n = 8) & (n = 6) \end{matrix}$$

Die Standardabweichung (S_E), d.h. die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte, wurde bestimmt aus:

$$S_E = \frac{\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2}{n - 1} \quad , \quad \begin{matrix} A & B & C \\ (n = 8) & (n = 8) & (n = 6) \end{matrix}$$

Der Fehler des Mittelwertes (S_M), d.h. die Streuung der Mittelwerte, ergab sich aus:

$$S_M = \frac{S_E}{n} \quad , \quad \begin{matrix} A & B & C \\ (n = 8) & (n = 8) & (n = 6) \end{matrix}$$

Es wurde der Test angewandt, der zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben (A/B) und zweier unabhängiger Stichproben (C/A, C/B) bezüglich ihrer Mittelwerte dient.

Hierbei wurden jeweils die beiden zu einer Versuchsperson gehörigen Meßwerte einander zugeordnet und ihre Differenz gebildet. Auf diese Weise wurden die starken Schwankungen in den Ausgangswerten kompensiert. Der t-Test war anwendbar, da die Verteilung der gebildeten Differenzen nicht wesentlich von einer Normalverteilung abwich.

Zur Prüfung der Frage, ob der Unterschied "statistisch gesichert" oder nach der üblichen Bezeichnung "signifikant" war, benutzten wir die sogenannte Nullhypothese.

Diese geht davon aus, daß zwischen den betrachteten Teilgesamtheiten keine echte Differenz vorhanden ist, die beiden verglichenen Stichproben also einer "einheitlichen Grundgesamtheit" entstammen. Trotzdem beobachtete Unterschiede seien rein zufällig. Man prüft nun die Wahrscheinlichkeit, die für diese Annahme spricht. Das hieß für uns:

Konnten wir die Nullhypothese mit der ausreichend kleinen Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ablehnen, so durfte der Unterschied zwischen den beiden Meßreihen als signifikant betrachtet werden. Andererseits bedeutet eine Irrtumswahrscheinlichkeit von mehr als 5 % nicht, daß kein Unterschied besteht, sondern nur, daß zwischen den betrachteten Stichproben keine signifikante Differenz gefunden werden konnte. Ein echter Unterschied könnte trotzdem vorliegen, aber erst bei größeren Untersuchungszahlen nachweisbar sein.

4. Ergebnisse

Von Gesamtphosphatiden, Cholesterin und Triglyceriden wurden die Werte in $\text{mg}/10^{11}$ RBC in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Da uns die Gesamtphosphatide in $\text{mg}/10^{11}$ RBC bekannt sind, jedoch der Anteil der einzelnen Phosphatidfraktionen nur prozentual, mußten die Prozentwerte der Fraktionen in $\text{mg}/10^{11}$ RBC umgerechnet werden. Hierbei wurden die Gesamtphosphatide (P) in $\text{mg}/10^{11}$ RBC gleich 100 % gesetzt. Die Werte für die Einzelfraktionen (P_i) wurden wie folgt berechnet:

$$E(PF_i) = \text{Anteil der Einzelfraktionen in \%}$$

$$P_i = \frac{P \cdot E(PF_i)}{100 \%}$$

Alle Werte der drei Gruppen A, B und C wurden ebenfalls in Tabelle 1 zusammengestellt und in einer graphischen Darstellung (Abb. 5) abgebildet.

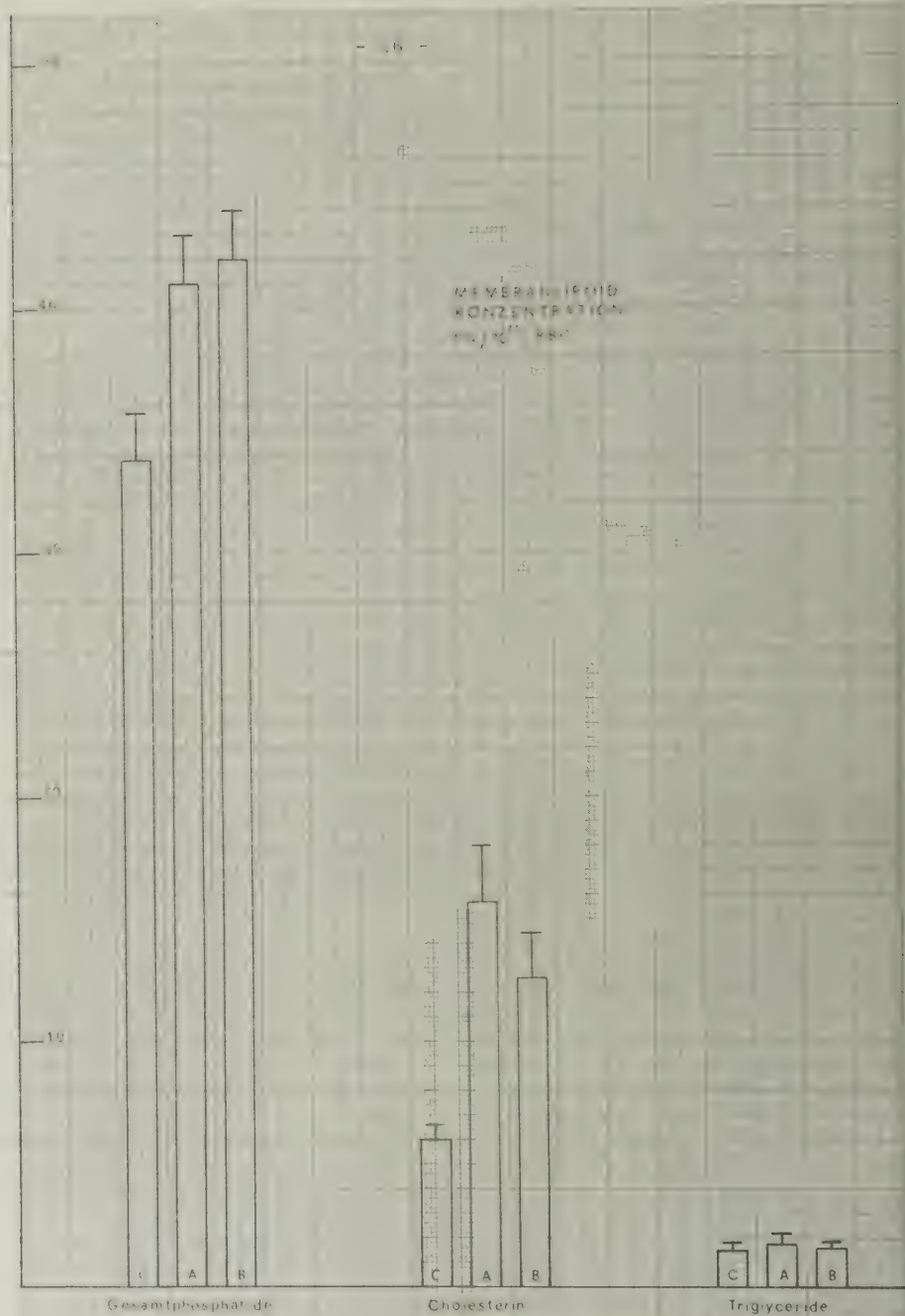
Klinische Phase

Rote Blutzellen (RBC)	Gruppe C		Gruppe A		Gruppe B	
	(n = 6)		(n = 8)		(n = 8)	
Cholesterin (mg/10 ¹¹ RBC ⁺)	5.92 [±] 0.63 → P < 0.001 ←		15.7 [±] 2.30 → P		0.001 ←	
Triglyceride (mg/10 ¹¹ RBC ⁺)	1.51 [±] 0.31 → P < 0.05 ←		1.87 [±] 0.37 →		NS ←	
Gesamtphosphatide (mg/10 ¹¹ RBC ⁺)	31.8 [±] 1.54 → P < 0.05 ←		41.0 [±] 2.01 →		NS ←	
Phospholipid-Fractionen(mg/10 ¹¹ RBC ⁺)	0.78 [±] 0.12 → P < 0.01 ←		1.73 [±] 0.55 →		NS ←	
Lysophosphatidyl choline (LPC)	7.6 [±] 0.68 → P < 0.001 ←		10.14 [±] 1.46 →		NS ←	
Sphingomyelin (SM)	10.29 [±] 1.79 → P < 0.01 ←		13.28 [±] 1.88 →		NS ←	
Phosphatidyl choline (PC)	1.12 [±] 0.63 → P < 0.05 ←		1.89 [±] 0.71 →		NS ←	
Lysophosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl inositol (LPE/PI)	4.16 [±] 0.58 →		4.79 [±] 1.12 →		NS ←	
Phosphatidyl serine (PS)	7.86 [±] 1.02 → P < 0.05 ←		9.19 [±] 0.94 →		NS ←	
Phosphatidyl ethanolamine (PE)						

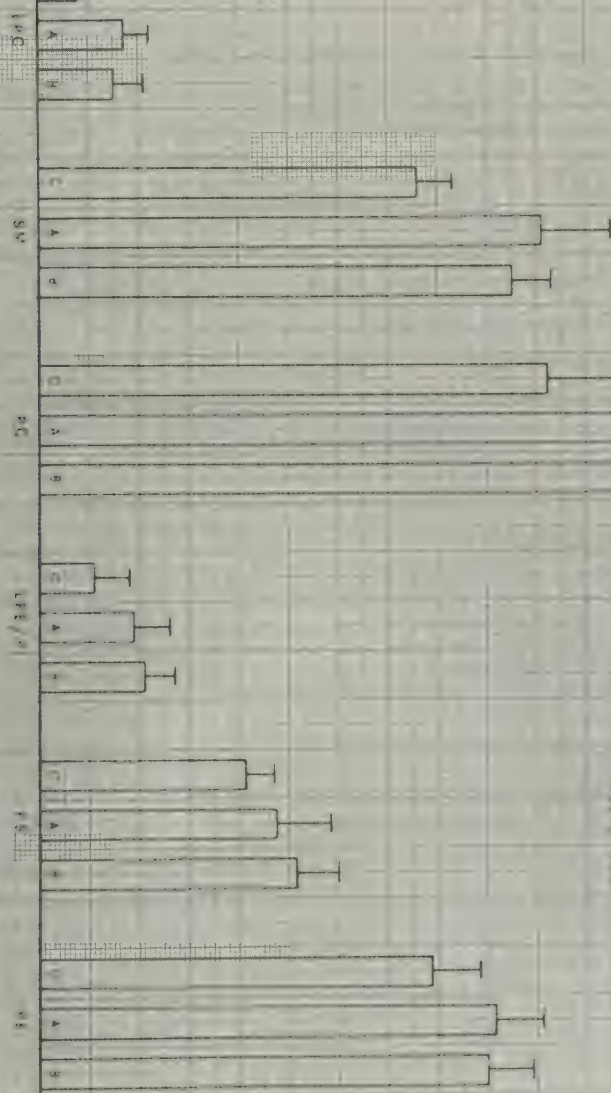
SU: Significant Unterschiede zwischen beiden klinischen Phasen (A B)

⁺ = Rote Blutzellen

1
35
1



MEAN HEDRAL III-
CONTINENT
1975-76



Mean

Mean

Gesamtphosphatide:

Es besteht ein signifikanter Unterschied des Phosphatidgehaltes der Erythrozytenmembran zwischen Stoffwechselgesunden und Zieve-Patienten.

Triglyceride:

Wie bei den Gesamtphosphatiden besteht auch hier der gleiche signifikante Unterschied.

Cholesterin:

Bei Zieve-Syndrom-Patienten im Hämolyseschub war der Cholesteringehalt signifikant erhöht, verglichen mit der Remissionsphase und mit Stoffwechselgesunden.

Phosphatidfraktionen:

Beim Vergleich gleicher Phosphatidfraktionen der Gruppen A, B und C wird ein signifikanter Anstieg aller Fraktionen bei Zieve-Syndrom-Patienten im akuten Stadium, verglichen mit Stoffwechselgesunden, ersichtlich.

Bei Lysophosphatidylcholine, Spingomyelin und Phosphatidylethanolamine ist eine Erniedrigung der Werte in der Remission zu beobachten. Hingegen steigen in dieser Phase die Werte für Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylethanolamine plus Phosphatidylinositol und Phosphatidylserine weiter an. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

5. Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse unserer Untersuchungen haben Unterschiede zwischen Zieve-Syndrom-Patienten und Stoffwechselgesunden ergeben.

Es ist durchaus möglich, daß bei Hyperphosphatidämie ohne Zieve-Syndrom, jeglicher Art, auch nicht alkoholisch induziert, Veränderungen der Erythrozytenmembranlipide auftreten. Es ist bekannt, daß Plasmalipidanteile im Austausch stehen mit korpuskulären Lipidbestandteilen (Erythrozytenmembranlipide) (21). - Die Tatsache wurde bisher für die einzelnen Erythrozytenmembranlipide noch nicht näher untersucht. - Es nimmt daher nicht Wunder, daß wir bei Alkoholikern mit symptomatischer Hyperlipoproteinämie eine Erhöhung der Erythrozytenlipide fanden, verglichen mit stoffwechselgesunden Nicht-Alkoholikern. Eine direkte hämolyseauslösende Bedeutung scheint diesen Veränderungen jedoch nicht zuzukommen, wie der Vergleich A/B zeigt: es fand sich einzig eine signifikante, aber geringe Cholesterinerhöhung in der Remission. Ansonsten waren keine signifikanten Erhöhungen zwischen Hämolysephase und Remission festzustellen. Wenn die Lipidveränderungen unmittelbar die Hämolyse neigung beförderten, sollte man bei diesem Vergleich signifikante Unterschiede erwarten. Denkbar ist hingegen, daß die veränderte Lipidzusammensetzung der Erythrozytenmembranen beim Zieve-Syndrom, in der Hämolyse wie in der Remission, mittelbar an der Erythrozytenmembranstabilität bei Zieve-Syndrom-Patienten beteiligt ist.

6. Zusammenfassung

Es wurden Erythrozytenlipide von sechs Stoffwechselgesunden und von 8 Zieve-Syndrom-Patienten im akuten Hämolyse-schub und in der Remission untersucht.

Dazu wurden die einzelnen Phosphatidfraktionen, Gesamtphosphatide, Cholesterin und Triglyceride der Erythrozytenmembranen bestimmt.

Beim Vergleich ergab sich eine signifikante Erhöhung der Erythrozytenlipide bei Zieve-Syndrom-Patienten gegenüber stoffwechselgesunden Nichtalkoholikern.

Da das Symptom der Hämolyse aber im akuten Stadium auftritt und nicht in der Remission, diese beiden Stadien jedoch keinen signifikanten Unterschied ihres Erythrozytenlipid-Gehaltes zeigen, scheint diesen Veränderungen keine direkte hämolyseauslösende Bedeutung zuzukommen.

7. Literaturverzeichnis

1. ALLEN, R.J.L.

The estimation of phosphorus.

Biochem. J.

34: 858 (1940)

2. BALZERZAK, S.P., WESTERMANN, M.P., HEINLE, E.W.

Mechanism of anemia in Zieve Syndrome.

American Journal of medical Science

255: 277-287 (1968)

3. BARLETT, G.R.

Phosphorus assay in column chromatography.

J. Biol. Chem.

234: 466 (1959)

4. BEHRENS, U.

Über die Haltbarkeit von Plasmalipoproteinen
bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank.

Inaugural-Dissertation,

Marburg (1976)

5. BUSCH, D., PELZ, K.

Erythrozytenisolierung aus Blut mit Baumwolle.

Klinische Wochenschriften

14: 983-984 (1966)

6. DEBUCH, H., MERTENS, W., WINTERFELD, M.

Quantitative Bestimmung der Phosphatide mit
Hilfe einer zweidimensionalen dünnschicht-
chromatographischen Methode.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.
349: 896 (1968)

7. DITTMER, J.C., LESTER, R.L.

A simple, specific spray for the detection of
phospholipids on thin-layer chromatograms.

J. Lipid. Res.
5: 126 (1964)

8. DODGE, J.T., MITCHEL, C., HANAAHN, D.

The Preparation and chemical characteristics
of hemoglobin - free ghosts of human
erythrocytes.

Arch. Biochem. Biophys.
100: 119 (1963)

9. EGGSTEIN, M., KREUTZ, F.H.

Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blut-
serum und Gewebe,

II. Mitteilung: Zuverlässigkeit der Methode,
andere Neutralfettbestimmungen, Normalwerte
für Triglyceride und Glycerin im menschlichen
Blut.

Klin. Wochenschr.
44: 267 (1966)

10. FISKE, C.H., SUBBAROW, Y.

The colorimetric determination of phosphorus.

J. Biol.Chem.

66: 375 (1925)

11. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLY, D.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

Journal of biological Chemistry

226: 497 (1957)

12. GOEBEL, K.M., GOEBEL, F.D., MÜHLFELLNER, G., KAFFARNIK, H.

Red cell metabolism in transient haemolytic anaemia associated with Zieve's syndrome.

European Journal of clinical Investigation

34: 83 (1975)

13. GOEBEL, K.M., GOEBEL, F.D., SCHUBOTZ, R., SCHNEIDER, J.

Red cell metabolic and Membrane features in haemolytic Anaemia of alcoholic liver disease (Zieve's-Syndrome).

British Journal of Haematology

35: 573 (1977)

14. JABIR, M.J.

Hyperlipoproteinämie bei stationären Patienten eines Kreiskrankenhauses: Häufigkeit, Typenverteilung und Korrelation zu weiteren Befunden.

Inaugural-Dissertation,

Marburg (1975)

15. JAFFE, E.R., GOTTFRIED, E.L.

Hereditary nonspherocytic hemolytic disease
associated with an altered phospholipid
composition of the erythrocytes.

Journal of clinical Investigation
47: 1375 (1968)

16. JEANNET, M., HÄSSIG, A.

The role of lysophosphatides and fatty acids
in haemolysis.

Vox sang. (Basel)
9: 113 (1964)

17. KATZ, K., VELASCO, M., GUZMANN, M., ALESSANDRI, H.

Red cell survival estimated by radioactive
chromium in hepatobiliary disease.

Gastroenterology
46: 399 (1964)

18. KUHN, D., MEISER, J., WAGNER, A., NEUBER, G.

Passagere hämolytische Anämie bei Hyperlipämie
und Leberschädigung infolge Alkoholismus
(Zieve-Syndrom).

Deutsche Medizinische Wochenschrift
90: 1634 (1966)

19. LEA, C.H., RHODES, D.N., STOLL, R.

Phospholipids
3. On the chromatographic separation of
glycerophospholipids.

Biochemical Journal
60: 353 (1955)

20. MARTINI, G.A., DÖLLE, W.

Krankheitsbilder bei Leberschädigung durch
Alkohol.

Deutsche Medizinische Wochenschriften
90: 793 (1965)

21. MAXWELL, M.P., BALCERZAK, S.P., HEINLE, E.W.

Red cell lipids in Zieve's syndrome: Their
relation to red cell osmotic fragility.

Journal of Laboratory and clinical medicin
72: 663 (1968)

22. ROESCHLAU, P., BERNT, E., GRUBER, E.

Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterin
im Serum.

Z. klin. chem., Klin. Biochemie
12: 226 (1974)

23. ROSE, H.G., OKLANDER, M.

Improved procedure for the extraktion of lipids
from human erythrocytes.

Journal of Lipid Research
6: 428 (1965)

24. RÜDIGER, H.W., BLUME, K.G., KAFFARNIK, H., FINKE, J.,
LÖHR, G.W.

Transitorische Hämolyse, Hyperlipämie und un-
spezifische Leberveränderungen bei Alkoholabusus
(Zieve Syndrom).

Blut 20: 178-184 (1970)

25. SCHMIDT, F.H., DAHL, K.

Zur Methode der enzymatischen Neutralfettbestimmung in biologischem Material.

Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochemie
6: 156 (1968)

26. STRAUB, P.W.

Alkoholwirkung auf das Blut.

Schweizer Medizinische Wochenschriften
105: 1072 (1975)

27. ZIEVE, L.

Jaundice, hyperlipemia and hemolytic anemia:
A heretofore unrecognized with alcoholic fatty
liver and cirrhosis.

Ann. int. Med.
48: 471 (1958)

28. ZÖLLNER, N., WOLFRAM, G.

Dünnschichtchromatographische Systeme zur Trennung
der Plasmalipoide.

Klinische Wochenschriften
40: 1101 (1962)

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren
Professoren und Dozenten:

Ahrens, Amon, Bernhardt, Bock, Bode, Castenholz,
Dimroth, Goell, Haberich, Hennis, Hensel, Henze,
Hering, Heuser, Jahnke, Karlson, Keil, Klein,
Koecke, Korb, Kühnel, Lehmann, Maroske, Niemeyer,
Nöth, Petry, Pfütz, Portig, Rohen, Rupec, Richter,
Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmidt, Schmitz-
Moormann, Schneider, Schnell, Seidel, Siegert,
Spröggel, Stuke, Walcher.

Herrn Prof. Dr. H. Kaffarnik möchte ich besonderen Dank aussprechen für die Möglichkeiten der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg sowie für die Überlassung des Themas.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. J. Schneider für seine freundliche Unterstützung und hilfreichen Hinweise zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Diplom-Mathematiker F. Löfel vom Rechenzentrum der Universität danke ich für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Für ihre hilfreiche Unterstützung möchte ich den Technischen Assistentinnen C. Gerhold und A. Mahla danken.

Frau M. Reichel danke ich für die Satzsetzung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 18. Juni 1948 wurde ich als Sohn des Bergmannes Adalbert Güldenstern und dessen Ehefrau Ruth, geborene Motkejus, in Herne geboren.

Von 1955 bis 1963 besuchte ich die Volksschule in Herne. Im Frühjahr 1963 wurde ich Schüler an der Hiberniaschule in Wanne-Eickel. Nach vier Jahren legte ich die Facharbeiterprüfung als Mechaniker ab und gleichzeitig erlangte ich die Fachschulreife.

Um das Abitur zu erlangen, besuchte ich im Anschluß das Hibernia-Kolleg in Wanne-Eickel, welches ich am 31. Januar 1970, nach Erlangung der Hochschulreife, verlassen habe.

Mit der Tätigkeit des Krankenpflegehelfers im Evangelischen Krankenhaus in Herne, überbrückte ich die Zeit, bis ich zum Wintersemester 1970/71 einen Studienplatz in Bonn im Fach Biologie bekam. Seit dem Sommersemester 1971 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg Zahnheilkunde. Nachdem ich am 13.9.1972 das Vorphysikum und am 15.3.1974 das Physikum absolviert hatte, bestand ich am 10.12.1976 erfolgreich mein Examen. Meine Approbation durch das Land Hessen erfolgte am 16.12.1976.

Seit dem 1.4.1977 diene ich als wehrpflichtiger Soldat im Range eines Stabsarztes bei der Bundeswehr.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Erythrozytenlipide bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Zieve-Syndrom im Hämolyseschub und in der Remission" in der Medizinischen Universitäts-Klinik Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Kaffarnik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 18. Juli 1977

Alfred Jaldenstru

